

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Amanda de Oliveira Baracho

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Caryocar
brasiliense* (CARYOCARACEAE) SOBRE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE)**

Diamantina

2018

Amanda de Oliveira Baracho

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Caryocar
brasiliense* (CARYOCARACEAE) SOBRE *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA:
PSYCHODIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Andrade Barata

Diamantina

2018

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

B223a	<p>Baracho, Amanda de Oliveira Avaliação do potencial inseticida de extratos de <i>Caryocar brasiliense</i> (<i>Caryocaraceae</i>) sobre <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Diptera: Psychodidae) / Amanda de Oliveira Baracho. – Diamantina, 2018. 57 p. : il.</p> <p>Orientador: Ricardo Andrade Barata</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Leishmaniose visceral. 2. Flebotomíneos. 3. Bioinseticida. 4. Pequi. I. Barata, Ricardo Andrade. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 595.7</p>
-------	--

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AMANDA DE OLIVEIRA BARACHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INSETICIDA DE EXTRATOS DE *Caryocar
brasiliense* (CARYOCARACEAE) SOBRE *Lutzomyia longipalpis*
(DIPTERA: PSYCHODIDAE)**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM
BIOLOGIA ANIMAL

Orientador : Prof. Dr. Ricardo Andrade
Barata

Data da aprovação : 26/04/2018



Prof.Dr. RICARDO ANDRADE BARATA - UFVJM



Dr. GUSTAVO FONTES PAZ - FIOCRUZ/MG



Prof.Dr. FERNANDO ARMINI RUELA - UFVJM

DIAMANTINA

Dedico este trabalho aos meus pais e a todos que, de alguma forma, contribuíram para sua conclusão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais e a todos os familiares que tornaram possível a realização deste trabalho. Mãe e pai, vocês permitem que eu compreenda o significado de “amor incondicional”. Aprendi que isto não se explica, apenas se sente.

Aos meus avós paternos (*in memoriam*) e à avó materna por todo o apoio e carinho durante este período, e por terem me enchido de bons exemplos.

Ao Dudu, uma pessoa incrível que entrou na minha vida para me mostrar a simplicidade das coisas. Obrigada por ter sido a minha válvula de escape nos momentos em que eu mais precisei.

Ao meu orientador, professor Ricardo Barata, por ter aberto as portas do laboratório de forma tão receptiva. Obrigada pelos ensinamentos, pelos conselhos a respeito da vida profissional e por me mostrar que eu posso encarar as coisas de forma mais leve. E obrigada pelo apoio e compreensão nos momentos de dificuldade, isto foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Ao Yrllan Sincurá, companheiro de laboratório com quem pude contar sempre. Obrigada pela ajuda, pelas boas conversas e pela troca de conhecimentos.

Ao Daniel Viana, técnico do LAPAR, pela ajuda na execução de procedimentos.

À professora Cristiane Grael, por se dispor a auxiliar na produção dos extratos.

À Cecília Souza, pela ajuda com as análises fitoquímicas.

À Dona Maria, por nos receber em sua casa sempre de forma agradável e permitir a exposição das armadilhas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os meus amigos pelo apoio de sempre, que, mesmo que de forma indireta e à distância, fortaleceram meu psicológico para que eu chegasse até aqui.

Aos especiais companheiros de percurso Steffani, Carol e Koe, amigos que aguentaram tantos desabafos durante esse período.

“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança” (Stephen Hawking).

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária de transmissão vetorial causada por protozoários do gênero *Leishmania*, com elevado grau de letalidade e que atinge milhões de pessoas no mundo. A busca por produtos alternativos para a eliminação do vetor tem como objetivo minimizar os impactos causados pelos inseticidas químicos sintéticos utilizados pelos programas de controle, sendo cada vez mais frequente a pesquisa em produtos de origem botânica com atividade inseticida. Organismos vegetais são capazes de produzir compostos orgânicos de comprovada toxicidade frente aos insetos e, diante disto, avaliou-se neste trabalho a atividade inseticida de extratos de *Caryocar brasiliense*, planta nativa do Cerrado popularmente conhecida como “pequi”, sobre flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, principal transmissora da leishmaniose visceral. Extratos hidroetanólicos, etanólicos e ciclohexânicos de folhas e cascas de *C. brasiliense* foram preparados e diluídos em solução de Tween 80 a 3% para a obtenção de concentrações a 50, 100, 200 e 400 mg.mL⁻¹, para a realização dos ensaios biológicos. Os flebotomíneos foram coletados em uma localidade rural do município de Diamantina/MG. Um número amostral de 30 flebotomíneos foi posto em contato com os extratos e a mortalidade foi avaliada após 1, 2, 4, 16, 24 48 e 72 horas de exposição, bem como grupos controle negativos (água destilada e Tween) e positivo (cipermetrina). A identificação dos constituintes químicos dos extratos também foi avaliada. Após 72h de experimento, foram registradas mortalidades de 93,3% pelo extrato hidroetanólico da casca a 400 mg.mL⁻¹, 66,3% pelo etanólico da casca a 50 mg.mL⁻¹ e 81,1% pelo ciclohexânico de folhas a 200 mg.mL⁻¹. Os extratos hidroetanólicos da casca mostraram-se estatisticamente semelhantes à ação da cipermetrina em 72h de experimento, indicando que este extrato foi o mais eficiente quanto à atividade inseticida. Foram identificados triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas nos extratos. Os resultados obtidos sugerem que os extratos hidroetanólicos de *C. brasiliense*, sobretudo das cascas, são promissores na busca por compostos naturais com atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis*.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral; Flebotomíneos; Bioinseticida; Pequi.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a vector-borne disease caused by a protozoan of the genus *Leishmania* with high lethality rate that reaches millions of people worldwide. The impacts caused by synthetic insecticides used in control programs are well known. In this context, research on alternative products for vector control, especially products of botanical origin, has been frequent in order to minimize the impacts of synthetic ones. Plants are capable to produce organic compounds with insect toxicity. Here, the insecticidal activity of *Caryocar brasiliense* extracts, a native plant of Brazilian savannah, popularly known as "pequi", on *Lutzomyia longipalpis*, the main vector of visceral leishmaniasis, was tested. Hydroethanolic, ethanolic and cyclohexanic extracts of leaves and barks of *C. brasiliense* were prepared and diluted in Tween 80 (3%) to obtain concentrations of 50, 100, 200 and 400 mg.mL⁻¹ for the biological tests. Phlebotomine sandflies were collected in a rural locality of Diamantina (Minas Gerais state, Brazil). Thirty sand flies were exposed to the extracts and mortality was evaluated after 1, 2, 4, 16, 24 48 and 72 hours of exposure, as well as negative control groups (distilled water and Tween) and positive (cypermethrin). Chemical compounds of the extracts were also evaluated. Mortalities rates of 93.3% were observed for the hydroethanolic extract of the bark at 400 mg.mL⁻¹, 66.3% for the ethanolic bark at 50 mg.mL⁻¹ and 81.1% for the cyclohexane of leaves at 200 mg.mL⁻¹. The hydroethanolic extracts of the bark showed to be statistically similar to the action of cypermethrin in 72h of the experiment, indicating that this extract was the most efficient as an insecticide. Triterpenes, steroids, tannins, flavonoids, alkaloids and saponins were identified in the extracts. The results obtained suggest that the hydroethanolic extracts of *C. brasiliense*, especially of the bark, are promising for the use of natural compounds to control *Lu. longipalpis*.

Keywords: Visceral leishmaniasis; Phlebotomine sandflies; Bioinsecticide; Pequi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Armadilha HP adaptada para captura de flebotomíneos exposta no interior de um galinheiro	26
Figura 2: Galinheiro utilizado como local para exposição de armadilhas para captura de flebotomíneos na localidade de Aroeira	26
Figura 3: Potes para a realização dos ensaios para avaliação inseticida dos extratos de <i>C. brasiliense</i> sobre <i>Lu. longipalpis</i>	27
Figura 4: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> pelo extrato hidroetanólico de folhas de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	32
Figura 5: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> pelo extrato hidroetanólico da casca de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	32
Figura 6: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> pelo extrato etanólico de folhas de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	34
Figura 7: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> pelo extrato etanólico da casca de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	34
Figura 8: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> pelo extrato ciclohexânico de folhas de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	36
Figura 9: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> pelo extrato ciclohexânico da casca de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> em contato com diferentes concentrações de extratos hidroetanólicos de folhas e cascas de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	31
Tabela 2: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> em contato com diferentes concentrações de extratos etanólicos de folhas e cascas de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	33
Tabela 3: Porcentagem da mortalidade de <i>Lu. longipalpis</i> em contato com diferentes concentrações de extratos ciclohexânicos de folhas e cascas de <i>C. brasiliense</i> em relação ao tempo de exposição	35
Tabela 4: Composição fitoquímica de extratos de <i>C. brasiliense</i> quanto às classes de metabólitos secundários	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α : Alfa

μg : Micrograma

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

Le: *Leishmania*

Lu: *Lutzomyia*

LV: Leishmaniose Visceral

LVC: Leishmaniose Visceral Canina

MS: Ministério da Saúde

nm: nanômetros

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

PCLV: Programa de Controle da Leishmaniose Visceral

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

UV: Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Leishmanioses.....	11
1.2 Flebotomíneos.....	14
1.3 Controle da leishmaniose visceral	17
1.4 Inseticidas botânicos	20
1.5 <i>Caryocar brasiliense</i>	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Material vegetal	25
4.1.1 Coleta e preparo do material vegetal.....	25
4.1.2 Elaboração dos extratos.....	25
4.2 Flebotomíneos.....	26
4.2.1 Local de coleta	26
4.2.2 Manutenção em laboratório.....	27
4.3 Avaliação da atividade inseticida	27
4.4 Identificação fitoquímica dos extratos	28
4.5 Análise dos dados	29
5. RESULTADOS	30
5.1 Avaliação da mortalidade de flebotomíneos.....	30
5.1.1 Extratos hidroetanólicos.....	30
5.1.2 Extratos etanólicos	33
5.1.3. Extratos ciclohexânicos.....	35
5.2 Identificação das classes de metabólitos secundários dos extratos.....	37
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÕES	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias de grande impacto na saúde pública devido à sua alta incidência e letalidade. Juntamente com a malária, dengue, doença de chagas e as filarioses, as leishmanioses são consideradas doenças vetoriais prioritárias sujeitas a controle (BRASIL, 2014). A transmissão endêmica das leishmanioses foi contabilizada em um total de 98 países, com aproximadamente 300.000 casos registrados por ano (ALVAR *et al.*, 2012). O Brasil está entre os países que reportam a maioria dos casos de leishmanioses no mundo e registra as mais altas taxas de mortalidade entre os territórios do continente americano (ALVAR *et al.*, 2012; PAHO, 2017).

Em 2015, de acordo com os dados disponibilizados pelo SINAN/SVS/MS, foram confirmados 3.289 casos de LV e 272 óbitos decorrentes da doença no Brasil. Apesar da ampla distribuição pelo território nacional, a maioria dos casos e óbitos continua sendo registrada na região Nordeste (PASTORINO *et al.*, 2002; BRASIL, 2014). Embora existam programas voltados para o controle, a transmissão da LV no país ainda está em expansão (WHO, 2017; REIS *et al.*, 2017).

Classificadas como zoonoses de transmissão vetorial, as leishmanioses são causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), membros da ordem Trypanosomatida (Kent, 1880) e família Trypanosomatidae (Doflein, 1901) (LAINSON, 2010; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Até os dias de hoje já foram descritas cerca de 50 espécies do gênero encontradas em diversos animais em todos os continentes, com exceção da Antártida, e mais de 20 espécies são responsáveis por causar patologias ao homem, agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (BATES, 2007; AKHOUNDI *et al.*, 2016; PAHO, 2017). A classificação destes dois grupos está relacionada com o local de desenvolvimento no trato digestório do hospedeiro invertebrado, divisão confirmada por análises filogenéticas através de sequenciamento de DNA (LAINSON; SHAW, 1987; BATES, 2007).

A patogenia das leishmanioses abrange um amplo espectro de sintomas com diferentes níveis de severidade, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) as classifica em quatro principais formas: cutânea (tegumentar), mucocutânea, visceral (calazar) e leishmaniose dérmica pós-calazar. As manifestações clínicas das leishmanioses dependem da espécie de

Leishmania envolvida no processo (LAINSON *et al.*, 1987; PELISSARI *et al.*, 2011; WHO, 2017). A transmissão acontece principalmente pela picada de fêmeas de flebotomíneos, pequenos insetos dípteros da família Psychodidae, mas existem relatos de transmissão congênita, por compartilhamento de seringas contaminadas e por transfusão de sangue (LAINSON; SHAW, 1978; COHEN *et al.*, 1991; MEINECKE *et al.*, 1999; CRUZ *et al.*, 2002).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave das leishmanioses por causar prejuízos tão severos que podem levar à morte caso não tratada a tempo. No Brasil, observada a gravidade e endemicidade da LV, o Ministério da Saúde a define como doença de notificação compulsória. Desta forma, toda e qualquer suspeita ou confirmação de caso devem ser informadas à Secretaria de Saúde do Município onde o paciente foi examinado (Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016). A notificação compulsória é uma medida que contribui para a vigilância epidemiológica da LV, pois permite um levantamento de dados com informações importantes para o conhecimento da epidemiologia da doença (BRASIL, 2014).

No Brasil, a LV é uma zoonose que tem como agente etiológico o protozoário *Leishmania* (*Le.*) *chagasi* (syn. *Le. (Le.) infantum*) e o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como principal vetor. No homem, é caracterizada por causar, de forma geral, febre irregular de longa duração com intensidade moderada, perda de peso significativa, anemia e aumento anormal do fígado e do baço. Se não houver tratamento, os sintomas podem evoluir para um quadro de intensa desnutrição, hemorragias, icterícia, edemas e ascite. Alterações laboratoriais como a pancitopenia e a hipergamaglobulinemia são comuns quando o tratamento não é realizado, e complicações como caquexia, hemorragias e infecções bacterianas podem levar o indivíduo a óbito (HERWALDT, 1999; REY *et al.*, 2005; BRASIL, 2014; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Ao picar um vertebrado, o flebotomíneo infectado secreta, no local da picada, uma saliva rica em moléculas com atividade anticoagulante e vasodilatadora, com o objetivo de facilitar a ingestão do sangue. O parasito, que se encontra na secreção do inseto na forma de promastigota, penetra na pele do hospedeiro e é internalizado por macrófagos, transformando-se em amastigotas ao perderem seu flagelo. Uma vez no interior dos macrófagos, eles se multiplicam e se disseminam no organismo através do sistema linfático, sendo capazes de infectar novos macrófagos e completar seu ciclo parasitário (CHAPPUIS *et al.*, 2007, BRASIL, 2014).

Leishmania é um gênero de parasitos zoonóticos multi-hospedeiros que podem ser mantidos por várias espécies na natureza. Testes sorológicos e detecção de DNA de *Le. chagasi* em vertebrados mostram que esta espécie é capaz de infectar vários animais domésticos e

sinantrópicos, como felídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2015; BALDINI-PERUCA *et al.*, 2017), canídeos (CURI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2016), roedores (ROQUE *et al.*, 2010; LARA-SILVA *et al.*, 2014), marsupiais (SHERLOCK, 1996; CARREIRA *et al.*, 2012) e quirópteros (NUNES *et al.*, 2016). Porém, com relação à importância epidemiológica, apenas algumas espécies mostraram ter um papel fundamental na manutenção do ciclo epidemiológico da LV, sendo classificadas como reservatórios de parasitos. Por definição, o hospedeiro vertebrado que é capaz de manter uma população do parasito por um longo período de tempo é chamado de hospedeiro reservatório (ASHFORD, 1996; ROQUE; JANSEN, 2014; CARREIRA *et al.*, 2017). À vista desta definição, as raposas (*Cerdocyon thous* e *Dusicyon vetulus*) e os marsupiais didelfídeos (*Didelphis albiventris*) desempenham o papel de reservatórios silvestres de *Le. chagasi* e, no ambiente urbano, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção do parasito para os flebotomíneos (DESJEUX, 2004; GRAMICCIA; GRANDONI, 2005; DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2014).

Estudos epidemiológicos revelam que a LV é mais frequente em crianças menores de 10 anos e o sexo masculino geralmente é o mais afetado (COSTA *et al.*, 1990; REY *et al.*, 2005; REIS *et al.*, 2017). Indivíduos que estejam em um quadro de desnutrição ou imunossupressão são mais susceptíveis à infecção e também à severidade dos sintomas. Além disso, a LV é considerada uma doença oportunista em pacientes com HIV, e a co-infecção da leishmaniose com o HIV é uma associação cada vez mais comum devido à sobreposição dos locais de ocorrência das duas infecções, e revela-se como um fator que eleva a letalidade dos pacientes (DESJEUX, 1996; REY *et al.*, 2005; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; SOUZA-GOMES *et al.*, 2011; COUTINHO *et al.*, 2017).

Inicialmente, a LV era uma doença típica de ambiente rural, atingindo pessoas que estivessem próximas ao hábitat natural do vetor e de reservatórios silvestres do parasito. Porém, habitações humanas foram se aproximando dos locais de ocorrência do ciclo zoonótico da LV, e o processo de urbanização das cidades com a consequente alteração do ambiente rural favoreceu a adaptação dos flebotomíneos às modificações provocadas pelo homem. Desta forma, as espécies vetorais, que eram originalmente silvestres, começaram a ser encontradas próximas às periferias das grandes cidades (DESJEUX, 1996; ROSÁRIO *et al.*, 2016). Durante surtos da LV, observou-se que movimentos migratórios podem contribuir para a expansão territorial da doença, tendo em vista que a migração de pessoas ou animais domésticos de áreas endêmicas para regiões indenes, aliada à presença do vetor, é suficiente para que a doença se

instale em regiões que anteriormente era inexistente (DESJEUX, 1996; COSTA *et al.*, 1990; ALVES, 2009).

O crescimento não planejado das cidades trouxe como consequência a formação de moradias e comunidades humanas em locais sem a devida infraestrutura dos serviços de saúde e recursos sanitários que fossem capazes de garantir a segurança contra doenças infectocontagiosas e parasitárias. Em muitos locais dos centros urbanos, principalmente nas periferias, ainda é possível encontrar disponibilidade de matéria orgânica ao ar livre. Isto contribui para o desenvolvimento de populações de flebotomíneos em meio às cidades, favorecendo a persistência da LV nos centros urbanos e associando a doença com as regiões mais pobres e com escassez de recursos (COSTA, 2008; REIS *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2017). Como consequência, a enfermidade atinge principalmente pessoas com menores condições socioeconômicas e baixo grau de escolaridade (ARAÚJO *et al.*, 2013; REIS *et al.*, 2017). Este panorama faz com que, muitas vezes, a LV seja uma doença negligenciada pelas políticas públicas, o que a torna carente de recursos para pesquisa, tratamento e controle.

A criação de animais domésticos no peridomicílio das residências e a presença de espécies sinantrópicas no ambiente urbano são fatores que contribuem para a sobrevivência e reprodução dos flebotomíneos e também para a existência de reservatórios de *Leishmania*. A coexistência do vetor com reservatórios do parasito e pessoas suscetíveis à infecção são fatores que preenchem todos os requisitos necessários para a manutenção do ciclo da doença (RANGEL; VILELA, 2008; VIANNA *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2017).

1.2 Flebotomíneos

Os flebotomíneos são insetos dípteros da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. São animais que não ultrapassam 3 mm de comprimento e são caracterizados por apresentarem o corpo completamente coberto de cerdas, o que lhes confere uma coloração palha. No Brasil, são popularmente conhecidos como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros, a depender da região (BRASIL, 2014; GALATI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017). Podem ser reconhecidos pelo característico comportamento de pousarem-se sobre a superfície com as asas em posição angular acima do abdômen. Sua abrangência compreende principalmente os lugares mais quentes do planeta, ocorrendo, sobretudo, entre os trópicos (KILLICK-KENDRICK, 1999; SHERLOCK, 2003; AKHOUNDI *et al.*, 2016). Os flebotomíneos estão distribuídos em praticamente todo o território brasileiro, registrando

presença em todas as regiões do país (BRASIL, 2014). Dos gêneros compreendidos na subfamília Phlebotominae, dois já possuem um *status* consolidado de transmissores de leishmanias ao homem: *Phlebotomus*, no Velho Mundo, com 12 subgêneros; e *Lutzomyia*, no Novo Mundo, com 15 subgêneros (GALATI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2017).

São insetos com ciclo de vida do tipo holometábolo, apresentando as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos têm formato elipsoide, medem em média de 300 a 500 μ m de comprimento e apresentam coloração amarelada, escurecendo algumas horas após a postura. As larvas são pequenas, brancas e vermiformes. As pupas são resistentes às variações de umidade, são esbranquiçadas e duram, em média, de uma a duas semanas até a emergência dos adultos, fase reprodutiva com nítido dimorfismo sexual (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Os flebotomíneos adultos obtêm energia de fontes naturais de açúcar, como seiva de plantas, frutos e secreções de afídeos. Porém, além da dieta de carboidratos, as fêmeas adultas necessitam do sangue de animais vertebrados para completar a maturação dos seus ovários, e esta alimentação pode ocorrer em diversas espécies, inclusive em humanos (QUINNELL *et al.*, 1992; SHERLOCK, 2003). A postura dos ovos ocorre geralmente de 3 a 8 dias após a hematofagia e as fêmeas são estimuladas a depositar seus ovos em um substrato úmido e rico em matéria orgânica, que servirá como fonte de nutrientes para as larvas. Após a oviposição, a eclosão das larvas ocorre em um período de 7 a 10 dias e, ao eclodirem, elas alimentam-se da matéria orgânica disponível no substrato, além de cascas dos ovos e adultos mortos (BRAZIL; BRAZIL, 2003). Em seguida, passam por três mudas, desenvolvendo quatro estádios larvais até se empuparem, período que pode durar até 3 semanas. Larvas de 4º estágio podem entrar em diapausa para resistir a condições adversas até que o ambiente esteja favorável ao seu desenvolvimento (BRASIL, 2014; KILLICK-KENDRICK, 1999). A fase de pupa atribui aos flebotomíneos uma certa resistência às variações do tempo e da umidade para que o inseto sofra as transformações necessárias para se tornar adulto, e esta fase imatura final dura em torno de uma a duas semanas. Foi observado que em condições de laboratório que os flebotomíneos adultos sobrevivem por aproximadamente 30 dias. Na natureza, a atividade dos adultos acontece predominantemente no período crepuscular e noturno, sendo que, durante o dia, procuram abrigar-se em locais frescos, úmidos e escuros. Normalmente são encontrados em cascas de árvores, cavernas, fissuras nas paredes das casas, rochas e sob folhas no solo (SHERLOCK, 1996; KILLICK-KENDRICK, 1999; BRAZIL; BRAZIL, 2003). Na hematofagia, as fêmeas são atraídas pela temperatura e odor dos corpos e o repasto geralmente ocorre no período crepuscular, noturno e no início da manhã (SHERLOCK, 1996). A digestão

do sangue ocorre em um período de 2 a 5 dias e o número de ovos produzidos é proporcional à quantidade de sangue ingerido. Não existe um consenso quanto à identificação dos criadouros naturais de flebotomíneos. Sendo assim, os sítios de oviposição e desenvolvimento das formas imaturas ainda não são claramente definidos (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Muitos estudos são conduzidos no sentido de compreender melhor a biologia e ecologia da subfamília Phlebotominae desde a constatação de espécies deste grupo como hospedeiras de parasitos causadores de doenças ao homem. Foi comprovada sua capacidade de transmissão de agentes patogênicos como protozoários do gênero *Leishmania*, bactérias do gênero *Bartonella* e alguns arbovírus (SHERLOCK, 2003; GALATI *et al.*, 2017).

O hábito alimentar hematófago das fêmeas permite a transferência de patógenos entre os animais alimentados por elas durante os repastos sanguíneos. Algumas fêmeas realizam o repasto apenas uma vez antes da postura dos ovos, mas outras podem se alimentar várias vezes de sangue antes de uma oviposição, aumentando, desta forma, o contato entre o vetor e um hospedeiro suscetível (BRAZIL; BRAZIL, 2003).

Ficou evidenciado que os flebotomíneos são facilmente adaptáveis às alterações do ambiente silvestre, sendo encontrados com grande frequência no ambiente antropizado (LAINSON; RANGEL, 2005; BARATA *et al.*, 2005; ROSÁRIO *et al.*, 2016). Os flebotomíneos foram gradativamente colonizando áreas rurais, e a partir de 1980 invadiram o ambiente urbano, especialmente as periferias das grandes cidades, sendo encontrados com frequência no peridomicílio e no interior das residências (LAINSON; RANGEL, 2005; RANGEL; VILELA, 2008). Visando encontrar um ambiente propício à manutenção do seu ciclo de vida, é comum que as populações se estabeleçam nos peridomicílios, principalmente naqueles que contam com a presença de abrigos de animais, como galinheiros e chiqueiros (DIAS *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

No Brasil, até o momento, duas espécies são apontadas como responsáveis por transmitir ao homem o parasito responsável pela forma mais severa das leishmanioses, sendo *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) o principal vetor de *Leishmania* (*Le.*) *chagasi* no país e alguns estudos tem mostrado a transmissão de *Le. (Le.) chagasi* por *Lu. cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado do Mato Grosso (MISSAWA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Lutzomyia longipalpis é a espécie mais importante no ciclo epidemiológico da LV no Brasil, pois é a principal responsável por sua transmissão. Sua abrangência no país é ampla e compreende as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, com exceção, até o momento, da região Sul (BRASIL, 2014). Uma das características da espécie é o fato dela apresentar

grande plasticidade adaptativa, mostrando-se capaz de sobreviver e manter seu ciclo biológico em diferentes habitats e condições climáticas (COSTA *et al.*, 2013, OLIVEIRA *et al.*, 2016). Sua persistente presença nos centros urbanos evidencia a sua habilidade de valer-se dos recursos disponíveis nestes locais para manter a alimentação, desenvolvimento e reprodução. Por consequência, exemplares de *Lu. longipalpis* são frequentemente coletados no peridomicílio, bem como no intradomicílio e nos abrigos de animais domésticos, o que comprova a proximidade entre esta espécie e o homem (DIAS *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013; VIANNA *et al.*, 2016).

Além de viverem em uma grande variedade de habitats, estes flebotomíneos também se mostraram bastante ecléticos com relação à alimentação sanguínea, sendo capazes de picar humanos, cães, aves, equinos, roedores e outros animais (QUINNELL *et al.*, 1992; DIAS *et al.*, 2003; LAINSON; RANGEL, 2005). Esta característica permite que eles se alimentem de diversos reservatórios de *Leishmania*, domésticos e silvestres, fazendo uma conexão entre animais infectados e suscetíveis de diferentes espécies. Desta forma, o comportamento e a ecologia do flebotomíneo se tornam fatores determinantes para a urbanização do ciclo da LV, tendo em vista a proximidade das populações humanas com os reservatórios silvestres e domésticos do parasito (RANGEL; VILELA, 2008).

Formas infectantes de *Le. chagasi* foram identificadas em *Lu. longipalpis*, tanto de forma experimental quanto de forma natural (LAINSON *et al.*, 1987; MICHALSKY *et al.*, 2011; LIDANI *et al.*, 2017). A capacidade de se infectar naturalmente de um parasito é um dos fatores que conferem a capacidade vetorial do díptero. De acordo com a proposta de Killick-Kendrick (1999), alguns critérios são utilizados para definir uma espécie como vetora de um parasito, dentre eles: alimentação em humanos e no animal reservatório; capacidade de suportar o parasito após a digestão; distribuição espacial coincidente com a de casos clínicos da doença e capacidade de transmissão do parasito para o homem.

1.3 Controle da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é uma doença de ocorrência global e a Organização Mundial da Saúde define alguns parâmetros para seu controle. Em 2016, a OMS e a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) publicaram um informe contendo um plano de ação que pretende eliminar doenças negligenciadas nas Américas, incluindo as leishmanioses, até o ano de 2022. O plano de ação busca adotar medidas que sejam capazes de diminuir as taxas de letalidade e

de transmissão da doença, com o objetivo de interromper a transmissão, eliminar as doenças e reduzir o risco de reintrodução das mesmas. A proposta inclui fortalecer a vigilância epidemiológica, o diagnóstico, o tratamento e o manejo de vetores, além de desenvolver, implementar e monitorar os programas para que eles atuem de forma integrada e contínua (PAHO, 2016).

O primeiro programa de controle da LV no Brasil foi implementado há mais de 50 anos e era composto por três medidas: distribuição gratuita do tratamento, controle dos vetores e controle dos reservatórios domésticos (COSTA, 2001). Porém, apesar da execução das propostas iniciais, a LV continuou em expansão pelo país, registrando surtos em alguns estados (COSTA *et al.*, 1990; COSTA *et al.*, 1995; RANGEL; VILELA, 2008), o que levou o Ministério da Saúde (MS) a reavaliar as estratégias de controle (COSTA, 2001). Isto aconteceu em razão da mudança do perfil epidemiológico da doença, justificado pela interferência da ação humana na ecologia de espécies de flebotomíneos e de espécies de leishmanias, e incluiu a educação em saúde como medida de prevenção da doença (RANGEL; VILELA, 2008).

As atuais medidas utilizadas para reduzir as taxas de mortalidade e o grau de morbidade da doença estão de acordo com o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), organizado pelo MS. A Vigilância Epidemiológica tem como objetivo realizar um estudo sistêmico do *status* da LV em um determinado local, buscando compreender e monitorar todos os fatores envolvidos na persistência da doença, o que inclui a vigilância entomológica, de casos humanos e casos caninos. Sendo assim, os principais objetivos da vigilância são: levantar informações quantitativas e qualitativas dos flebotomíneos em determinada região; estudar casos caninos com os sintomas clínicos da doença; e investigar os casos humanos confirmados ou com suspeita de LV. O diagnóstico e tratamento precoces dos casos humanos reduzem as taxas de letalidade da doença, e os controles do vetor e dos reservatórios contribuem para a redução da transmissão entre animais infectados e humanos sadios (ARAÚJO *et al.*, 2013; BRASIL, 2014).

Porém, alguns autores identificaram dificuldades na execução das diretrizes direcionadas ao controle da LV, o que pode levar à interrupção das medidas. Os principais problemas foram relacionados com a logística e alto custo para o controle químico do vetor, a execução inadequada do tratamento humano e a dificuldade de controle da leishmaniose visceral canina (LVC) (PELISSARI *et al.*, 2011; VON ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Com relação à LVC, os levantamentos de casos da LV humana propõem que a infecção canina preceda os casos humanos. Sendo assim, devido às altas taxas de infecção canina, ao grande intervalo entre o diagnóstico e eliminação dos cães infectados, e à resistência da

população humana com a eutanásia de cães infectados, o cão continua agindo como reservatório doméstico e permitindo a permanência da infecção por *Leishmania* nas cidades (ARAÚJO *et al.*, 2013; BRASIL, 2014; VON ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Em uma doença de ciclo vetorial, o vetor é peça chave para a manutenção da enfermidade em uma população. Sendo assim, ao eliminar o vetor, interrompe-se o ciclo de transmissão da doença. A vigilância entomológica, que faz parte do PCLV, tem como objetivo principal identificar a presença e os locais de distribuição e dispersão do vetor, a fim de investigar os possíveis focos de transmissão da leishmaniose visceral. O monitoramento das investigações entomológicas possibilita conhecer o perfil da transmissão vetorial da LV e, desta forma, direcionar as ações de prevenção e controle (BRASIL, 2014).

Atualmente, a aplicação domiciliar e peridomiciliar de inseticidas químicos de ação residual é a medida utilizada para reduzir a população do vetor e diminuir o contato entre ele e o homem, e o principal produto empregado é a alfacipermetrina, da classe dos piretroides (ALEXANDER; MAROLI, 2003; BRASIL, 2014). *Lutzomyia longipalpis* mostrou suscetibilidade a estes compostos em testes de laboratório e, no campo, coletas periódicas mostraram redução da densidade destes insetos após a borrifação nos domicílios por até dois meses (FALCÃO *et al.*, 1991; PASSERAT-DE-SILANS *et al.*, 1998). Porém, apesar da eficiência, a borrifação de piretroides no intra e peridomicílio é um desafio para os programas, por se tratar de um procedimento complexo e de custo elevado, demandando recursos materiais e de pessoal treinado para a realização. Muitas vezes a medida é interrompida por falta de recursos materiais e/ou humanos e pela recusa da população em permitir a aplicação domiciliar (VON ZUBEN; DONALÍSIO, 2016).

Ainda de acordo com o PCLV, a borrifação dos inseticidas químicos não é recomendada nas áreas de transmissão esporádica ou apenas com transmissão canina. Aconselha-se que sejam realizadas ações de manejo ambiental como medidas de controle vetorial nestas áreas com o objetivo de reduzir as condições que possam favorecer o estabelecimento de criadouros do vetor (VON ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Contudo, não existem evidências da efetividade do manejo ambiental sobre as fases imaturas do inseto, tendo em vista o escasso conhecimento a respeito dos seus criadouros. Assim, o controle do vetor restringe-se ao combate aos insetos adultos (AMÓRA *et al.*, 2009).

Devido às dificuldades encontradas para a implementação adequada das medidas de controle vetorial, a descontinuidade das ações e a aplicação de doses e quantidades incorretas dos inseticidas são fatores que potencializam seus efeitos negativos sobre a saúde humana e o

meio ambiente. A negligência com relação os critérios a serem respeitados para que a borrifação dos inseticidas químicos seja segura contribuem para o aparecimento das consequências negativas do seu uso, como a intoxicação de profissionais e moradores expostos ao produto, a contaminação da água e do solo, o aparecimento de organismos-alvo resistentes à substância e uma possível acumulação de resíduos tóxicos em alimentos. Além disto, a baixa seletividade das substâncias sintéticas faz com que ela atinja e prejudique animais não-alvo (VIEGAS-JÚNIOR, 2003; MENEZES, 2005; CORRÊA; SALGADO, 2011).

A utilização de inseticidas por programas de controle de outras doenças de transmissão vetorial, como malária e dengue, afeta as populações de flebotomíneos, devido à sobreposição espacial da ocorrência destas doenças. A exposição contínua do vetor aos inseticidas comerciais pode gerar resistência, uma habilidade genética que permite a tolerância do inseto frente a uma substância que antes era tóxica a ele, até que o produto perca a atividade contra o organismo. Uma significativa redução da suscetibilidade de *Lu. longipalpis* a inseticidas foi observada por Alexander *et al.* (2009), que identificaram pelo menos três mecanismos de desintoxicação enzimática desta espécie contra alguns inseticidas comumente utilizados pelos programas, como a permetrina, o malathion e a deltametrina. Isto pode ter acontecido em resposta às pressões seletivas causadas por borrifações inadequadas pelos programas de controle da LV e de outras doenças de transmissão vetorial, visto que os flebotomíneos são suscetíveis aos mesmos inseticidas (CHAPPUIS *et al.*, 2007; ALEXANDER *et al.* 2009).

1.4 Inseticidas botânicos

As interações inseto-planta são um exemplo de coevolução e, devido a isto, ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos físicos e químicos para interagir com o meio. O metabolismo secundário de espécies vegetais se refere à produção de compostos químicos que não estão envolvidos nos processos vitais da planta, como crescimento e reprodução. Sendo assim, estes produtos estão envolvidos em funções ecológicas, em que a planta produz substâncias para interagir com outras espécies, garantindo sua sobrevivência e perpetuação (SIMÕES *et al.*, 2007). Essas interações podem estar envolvidas na atração de polinizadores e/ou dispersores e também na defesa contra animais herbívoros. As substâncias tóxicas para outros organismos são conhecidas como fitotoxinas (CORRÊA; SALGADO, 2011; MACIEL *et al.*, 2010a).

Os compostos orgânicos biossintetizados por organismos vegetais podem ter atividade tóxica, repelente, deterrente alimentar e de oviposição, além de prejudicarem estágios de desenvolvimento de insetos ou outros organismos que causam prejuízos ao homem (CAVALCANTE *et al.*, 2006; ZOUBIRI; BAALIOUAMER, 2014).

Produtos de origem vegetal ou derivados foram muito utilizados no controle de pragas agrícolas até a década de 40, como o piretro, a rotenona e a nicotina, pela sua eficiência e segurança com relação aos impactos ambientais. Porém, a criação dos inseticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides levou à substituição dos inseticidas botânicos pelos sintéticos, devido à sua maior eficiência no combate às pragas (MENEZES, 2005). Mas apesar de eficaz, a utilização destes produtos trouxe consequências negativas à saúde humana e ao meio ambiente, e isto fez com que a bioprospecção voltasse a ser alvo de inúmeras pesquisas na área. Os estudos visam encontrar produtos naturais que possam substituí-los, com a intenção de investigar e desenvolver novas formulações que minimizem os problemas causados pelos inseticidas sintetizados industrialmente.

Em comparação com os produtos sintéticos, as substâncias de origem natural oferecem menores riscos ao homem e ao meio ambiente, pois são de rápida degradação, não deixam resíduos em alimentos, manifestam baixa ou nenhuma toxicidade a mamíferos e são obtidos de recursos renováveis. Além disso, o desenvolvimento de resistência aos princípios ativos das plantas ocorre mais lentamente, por se tratar de um composto formado pela associação de várias moléculas (CORRÊA; SALGADO, 2011; MACIEL *et al.*, 2010a). Sendo assim, uma vez conhecidos os impactos causados pelos produtos sintéticos, os compostos naturais podem ser vistos como uma alternativa à sua utilização.

1.5 *Caryocar brasiliense*

Caryocar brasiliense (Camb.) é uma espécie arbórea nativa do cerrado brasileiro e faz parte da família Caryocaraceae, grupo distribuído nas Américas Central e do Sul. No Brasil, a espécie é popularmente conhecida por “pequi” e ocorre principalmente nos estados das regiões Sudeste e Centro-Oeste (ARAÚJO, 1995; COLLEVATTI *et al.*, 2003). O fruto e a amêndoa do pequi são comestíveis e constituem uma importante fonte de alimento para as populações locais, sendo utilizados para a fabricação de doces, licores, sorvetes e em pratos típicos. As sementes e o mesocarpo produzem grande quantidade de óleo rico em lipídeos que pode substituir outros óleos ou manteigas na cozinha. Seu valor social envolve grande importância econômica e

cultural, sendo muito apreciado na culinária regional e utilizado pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Óleos essenciais e extratos de diferentes partes da planta são investigados desde a década de 1980 quanto à composição fitoquímica, e a espécie revelou ser capaz de produzir diferentes classes de compostos bioativos (ARAÚJO, 1995).

O interesse pela espécie advém principalmente das diversas propriedades nutricionais e minerais presentes na polpa e no óleo do fruto, por ser caracterizado como um alimento rico em lipídeos, fibras, proteínas, carboidratos, ácidos graxos, compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas, além de minerais como fósforo, potássio, manganês, cálcio, cobre, ferro e zinco (LIMA *et al.*, 2007; MARIANO-DA-SILVA *et al.*, 2009; MIMURA *et al.*, 2016). A composição química do pequizeiro indica ainda uma alta capacidade antioxidante, e o alto teor de lipídeos sugere um potencial para a fabricação de biodiesel a partir da extração do óleo da polpa (ROESLER *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2013; LOPES; NETO, 2017).

Óleos essenciais e extratos de várias partes da planta mostraram atividade tóxica a moluscos vetores de doenças e a protozoários, bactérias e fungos patogênicos (BEZERRA *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2002, PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2018). Estes estudos abrem margem para a investigação de outras atividades biológicas, pois permite inferir que os extratos de pequi apresentam efeitos sobre vários grupos de organismos vivos. Isto contribui com a escolha desta espécie para a avaliação do seu potencial tóxico sobre insetos.

2. JUSTIFICATIVA

O programa de vigilância da LV no Brasil foi instaurado pela primeira vez há mais de cinco décadas, e, desde então, apesar de existirem as ferramentas para o controle, a leishmaniose visceral continua com os índices elevados entre a população. Para que um programa tenha sucesso no controle de uma doença, é necessário que todas as medidas sejam empregadas de forma integrada e contínua, permitindo que o ciclo do parasito seja interrompido e, a doença, eliminada.

Particularidades como a complexidade do ciclo da doença, a resistência da população frente ao controle químico do vetor e ao controle de reservatórios, juntamente com a negligência por parte das políticas públicas, são aspectos que impedem a redução das taxas de infecção e a possibilidade de eliminação da doença. Desta forma, fatores como a administração incorreta do medicamento e da respectiva dose, a deficiência na educação em saúde, a ineficiência do controle de reservatórios de leishmânias e a dificuldade de se manter o controle químico do vetor são os principais obstáculos para a eliminação da LV.

O controle dos reservatórios apresenta-se de forma quase que inviável, tendo em vista a resistência da população quanto à eutanásia de animais domésticos infectados e a dificuldade de se controlar os reservatórios silvestres. O diagnóstico tardio e a administração incorreta da quimioterapia para LV contribuem para a permanência dos casos humanos e de óbitos em decorrência da doença. O controle vetorial, realizado na forma de aplicação de inseticidas químicos de ação residual, é uma medida de difícil aceitação pela população e tem sido de pouca eficiência devido às dificuldades de implementação e manutenção. Por fim, os efeitos negativos causados pela utilização inadequada dos produtos sintéticos disponíveis para os programas de controle vetorial impulsionam as pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novas formulações.

A busca por soluções para o controle da LV deve ser constante, pois, apesar dos esforços, a endemia ainda é uma realidade brasileira. Diante dos fatos citados, a proposta deste trabalho foi realizar um teste preliminar que indique o potencial inseticida dos extratos de *C. brasiliense* sobre flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*, visando atenuar os problemas relacionados ao controle químico de flebotomíneos. A intenção é propor uma nova alternativa ao controle da LV que seja capaz de unir o controle da zoonose às propostas de preservação ambiental. Isto pode ser feito através da prospecção de substâncias de origem natural que sejam mais específicas no combate aos vetores, ao mesmo tempo em que contribuem para a diminuição dos impactos causados pelos produtos sintéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial inseticida de extratos de *C. brasiliense* sobre a mortalidade de flebotomíneos adultos selvagens da espécie *Lu. longipalpis* em condições de laboratório.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar extratos hidroetanólico, etanólico e ciclohexânico de folhas e cascas de *C. brasiliense*;
- Avaliar o efeito adulticida dos extratos de *C. brasiliense* sobre flebotomíneos selvagens da espécie *Lu. longipalpis*;
- Identificar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos de *C. brasiliense*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

4.1.1 Coleta e preparo do material vegetal

Folhas e cascas de *C. brasiliense* foram coletadas em Diamantina/MG, no distrito de Mendanha (18°5'43"S; 43°31'41"O) em outubro de 2016. A identificação taxonômica foi obtida através de especialistas do Herbário Dendrológico Jeanini Felfili da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Campus JK), onde as amostras foram depositadas sob registro HDJF – 4637.

O material vegetal fresco foi submetido ao processo de secagem em estufa de circulação forçada até a completa desidratação. O material seco foi triturado em moinho de facas (Willey SL31 Solab®) para a obtenção de um pó fino, destinado à extração. A pulverização permite que exista uma maior superfície de contato entre a planta e o solvente extrator, possibilitando maior eficiência na extração dos componentes químicos.

4.1.2 Elaboração dos extratos

Das folhas e cascas secas, foram obtidos três extratos botânicos por maceração de acordo com o solvente: etanólico (Etanol PA), hidroetanólico (Etanol PA mais água destilada, 3:1, v/v) e ciclohexânico (Ciclohexano PA). Aproximadamente 200g de pó vegetal foi adicionado a aproximadamente 500 mL de solvente para extração. A mistura ficou por 48 h sob abrigo da luz e filtrada em seguida, e o processo de maceração foi repetido até que o sobrenadante adquirisse cor clara. A repetição do processo foi feita com o objetivo de extrair a maior quantidade possível de compostos da planta. Os três solventes foram escolhidos com o intuito de obter produtos com diferentes níveis de polaridade.

Após a maceração, os extratos foram processados em equipamento rotavapor (Fisatom® 802) a 40-42°C sob pressão reduzida para a eliminação dos solventes orgânicos da amostra. O extrato hidroetanólico passou ainda pelo processo de liofilização (Terroni® LS 3000) para a remoção completa da água. Os extratos foram mantidos em dessecador de vidro com sílica para evitar a contaminação biológica.

4.2 Flebotomíneos

4.2.1 Local de coleta

Os flebotomíneos utilizados nos bioensaios foram coletados em Aroeira (18°8'8"S, 43°38'5"O), comunidade rural do município de Diamantina/MG. Armadilhas luminosas do tipo HP (PUGEDO *et al.*, 2005) adaptadas foram expostas no peridomicílio ao final da tarde e retiradas pela manhã (Figura 1). As coletas dos animais selvagens para ensaio foram realizadas dois dias antes de cada experimento. O local de exposição foi escolhido pelas características do microambiente, formado pela presença de animais e matéria orgânica. As armadilhas foram colocadas no interior de um galinheiro que se situava próximo ao domicílio (Figura 2).



Figura 1. Armadilha HP adaptada usada para a captura de flebotomíneos exposta no interior de um galinheiro.



Figura 2. Galinheiro utilizado como local para exposição de armadilhas para captura de flebotomíneos na localidade de Aroeira.

4.2.2 Manutenção em laboratório

Os flebotomíneos capturados foram levados ao Laboratório de Parasitologia da UFVJM, onde permaneceram em repouso dentro de gaiolas por 24 horas até o início do experimento. Algodões embebidos com água e solução açucarada foram colocados sobre a gaiola, proporcionando umidade e fonte de açúcar para os animais.

Parte dos insetos foi retirada para identificação específica segundo a classificação proposta por Young e Duncan (1994).

4.3 Avaliação da atividade inseticida

Foi realizado um total de três ensaios, cada um destinado para a avaliação da atividade biológica de um tipo de extrato. Os extratos de *C. brasiliense* foram diluídos em solução de polisorbato 80 (Tween®) a 3% para a obtenção das concentrações de teste: 50, 100, 200 e 400 mg.mL⁻¹.

Os flebotomíneos foram transferidos das gaiolas, com auxílio de um capturador manual, para potes de plástico translúcido com papel filtro ao fundo. Cada pote conteve um número amostral de 30 espécimes de *Lu. longipalpis*, sendo 15 machos e 15 fêmeas. A parte superior dos potes foi coberta com tecido de malha fina para permitir a entrada de oxigênio e também foram adicionados algodões embebidos com água e solução açucarada (Figura 3).



Figura 3. Potes para a realização dos ensaios para avaliação inseticida dos extratos de *C. brasiliense* sobre *Lu. longipalpis*.

Os tratamentos utilizados foram os extratos e suas respectivas concentrações, além de três grupos controle: positivo (α -cipermetrina $196 \mu\text{g.mL}^{-1}$), negativo (água destilada) e Tween® 80 a 3%. O controle positivo representa o inseticida utilizado comercialmente para o controle químico de flebotomíneos; a água permite a avaliação de possíveis mortes naturais e o controle feito com Tween teve como objetivo estimar se houve interferência da substância na mortalidade registrada pelos extratos.

Os testes foram realizados em triplicatas e 300 μL de cada tratamento foi adicionado no papel filtro ao fundo dos potes, e a mortalidade dos insetos foi registrada após 1, 2, 4, 16, 24, 48 e 72 horas do início da aplicação. Os flebotomíneos foram identificados como mortos quando se apresentavam deitados sobre a superfície e não se movimentavam quando estimulados por toques no pote.

4.4 Identificação fitoquímica dos extratos

A investigação das classes de metabólitos secundários presentes nos extratos foi realizada de acordo com a metodologia de prospecção preliminar proposta por Matos (1997), que consiste na realização de reações cromogênicas e de precipitações para a identificação de determinados grupos funcionais. Os extratos passaram por uma triagem para a identificação das seguintes classes de compostos orgânicos: triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas e cumarinas. Todos os testes foram validados através da comparação da solução reativa com um teste em branco. A descrição da metodologia está disposta a seguir:

- A presença de triterpenos e/ou esteroides foi identificada pelo aparecimento de cores rosa, azul ou verde após uma reação entre uma alíquota do extrato diluída em clorofórmio com o reagente de Liebermann-Burchard (2,0 mL de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado).
- Para a detecção de taninos, 2 mg do extrato foram diluídos em água destilada e solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 10%. A coloração azulada como resultado da oxidação da substância indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a cor verde acusa a presença de taninos condensados.
- A reação para identificação de flavonoides nas amostras foi realizada pela adição de hidróxido de amônia em 2 mL de solução aquosa do extrato (1 mg.mL^{-1}) até a obtenção de pH 11. O aparecimento de cor amarela aponta a presença de flavonas, flavonóis e

xantonas, enquanto a coloração vermelho-púrpura revela que o extrato contém chalconas e auronas. É possível ainda identificar flavanonas na amostra quando a reação resultar em coloração vermelho-laranja.

- Para averiguar a presença de alcaloides, 2 mL de solução aquosa do extrato (1mg.mL^{-1}) foram misturados ao reagente Dragendorff (iodo-bismutato de potássio) e a substância mostra-se presente quando há a formação de precipitado floculoso na solução.
- A formação de espuma persistente em uma solução aquosa do extrato, quando submetida à agitação vigorosa por 2 minutos, revela a presença de saponinas na amostra.
- Para a verificação de cumarinas, uma pequena quantidade do extrato foi exposta em placa com sílica e borrifada com uma mistura de hidróxido de sódio e água a 10% (p/v). A revelação da placa sob luz UV (360 nm) indica a presença de cumarinas com o aparecimento de fluorescência azulada.

4.5 Análise dos dados

Os dados foram analisados através das porcentagens das médias entre as triplicatas. O teste estatístico utilizado para comparar as proporções entre os grupos em cada tempo de exposição foi a análise de variância (ANOVA) seguida do teste Scott-Knott considerando o nível de significância de 0,05 %, obtido pelo software SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2010).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da mortalidade de flebotomíneos

Os extratos preparados a partir de folhas e cascas de *C. brasiliense* mostraram-se tóxicos aos flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* e a toxicidade variou de acordo com as concentrações, com a parte da planta utilizada e com o tempo de exposição. A mortalidade dos animais foi tabulada na forma de porcentagem das médias dos dados brutos obtidos das triplicatas (Tabelas 1, 2 e 3). Com relação às concentrações, os resultados apontam que o aumento da mortalidade dos insetos não foi diretamente proporcional ao aumento da concentração dos extratos.

De forma geral, durante as primeiras quatro horas de experimento não houve mortalidade significativa dos insetos submetidos aos extratos e aos controles negativo e Tween. Porém, a partir de 16 horas de exposição, a taxa de mortalidade dos flebotomíneos começou a apresentar uma variação positiva nestes grupos. Em contrapartida, observa-se que a cipermetrina inicia sua ação sobre os flebotomíneos a partir da primeira hora de experimento, atingindo uma taxa de aproximadamente 50% de mortalidade dos insetos.

O controle negativo esclareceu que os extratos foram tóxicos aos flebotomíneos, pois a mortalidade registrada por esse grupo foi estatisticamente inferior. Isto mostra que os animais que não foram expostos a nenhum tipo de substância tiveram uma maior sobrevivência durante o período do ensaio. O controle elaborado com o Tween possibilitou a conclusão de que esta substância não interferiu na ação dos extratos sobre os insetos, pois exibiu resultados estatisticamente inferiores àqueles obtidos pelos extratos.

5.1.1 Extratos hidroetanólicos

Dos extratos hidroetanólicos de pequi, a casca foi o mais tóxico aos flebotomíneos, alcançando 93,3% de mortalidade em 72 h na concentração de 400 mg.mL⁻¹ (Tabela 1). Das folhas, a concentração de 100 mg.mL⁻¹ foi a que apresentou maior taxa de mortalidade, sendo esta com uma porcentagem de 81,1 % de insetos mortos após 72 h de experimento (Figuras 4 e 5). Os resultados apontam que não houve diferença significativa entre os valores obtidos dos extratos hidroetanólicos da casca do pequi e o controle positivo em 72 h

de exposição. Ao final do experimento, os dados obtidos pelos controles negativo e Tween foram estatisticamente inferiores aos dos extratos.

Tabela 1: Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* em contato com diferentes concentrações de extratos hidroetanólicos de folhas e cascas de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

		Mortalidade %						
	Tratamento	1h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
Folhas	50 mg.mL ⁻¹	2,20 ^{aA}	4,43 ^{aA}	4,43 ^{aA}	18,86 ^{bB}	30,00 ^{cB}	62,20 ^{dC}	75,53 ^{bD}
	100 mg.mL ⁻¹	3,33 ^{aA}	4,43 ^{aA}	6,66 ^{aA}	22,20 ^{bB}	34,43 ^{dB}	64,43 ^{dC}	81,10 ^{bD}
	200 mg.mL ⁻¹	2,20 ^{aA}	2,20 ^{aA}	3,33 ^{aA}	20,00 ^{bB}	31,10 ^{cB}	61,10 ^{dC}	78,86 ^{bD}
	400 mg.mL ⁻¹	3,33 ^{aA}	4,43 ^{aA}	6,66 ^{aA}	13,33 ^{aA}	15,53 ^{bA}	34,43 ^{bB}	65,53 ^{bC}
Cascas	50 mg.mL ⁻¹	1,10 ^{aA}	1,10 ^{aA}	1,10 ^{aA}	13,33 ^{aB}	25,53 ^{cB}	54,43 ^{cC}	87,76^{cD}
	100 mg.mL ⁻¹	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	2,20 ^{aA}	10,00 ^{aB}	16,66 ^{bB}	52,20 ^{cC}	87,76^{cD}
	200 mg.mL ⁻¹	11,00 ^{aA}	2,20 ^{aA}	2,20 ^{aA}	8,86 ^{aA}	22,20 ^{cB}	50,00 ^{cC}	87,76^{cD}
	400 mg.mL ⁻¹	5,53 ^{aA}	6,66 ^{aA}	6,66 ^{aA}	30,00 ^{bB}	43,33 ^{dC}	74,43 ^{dD}	93,33^{cE}
Controles	Água	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	1,11 ^{aA}	2,22 ^{aA}	6,67 ^{aB}	33,33 ^{aB}
	Tween	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	2,22 ^{aA}	6,67 ^{aA}	32,22 ^{bB}	43,33 ^{aB}
	Cipermetrina	48,89 ^{bA}	70,00 ^{bB}	83,33 ^{bC}	100 ^{cD}	100 ^{eD}	100 ^{eD}	100^{cD}
CV (%)	26.01							

Letras minúsculas comparam os valores nas colunas. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras em ordem alfabética classificam os valores em ordem crescente. Foi considerado $p < 0,05$ pelo teste de análise de variância seguido por Scott-Knott. Valores destacados em negrito representam resultados estatisticamente semelhantes entre si.

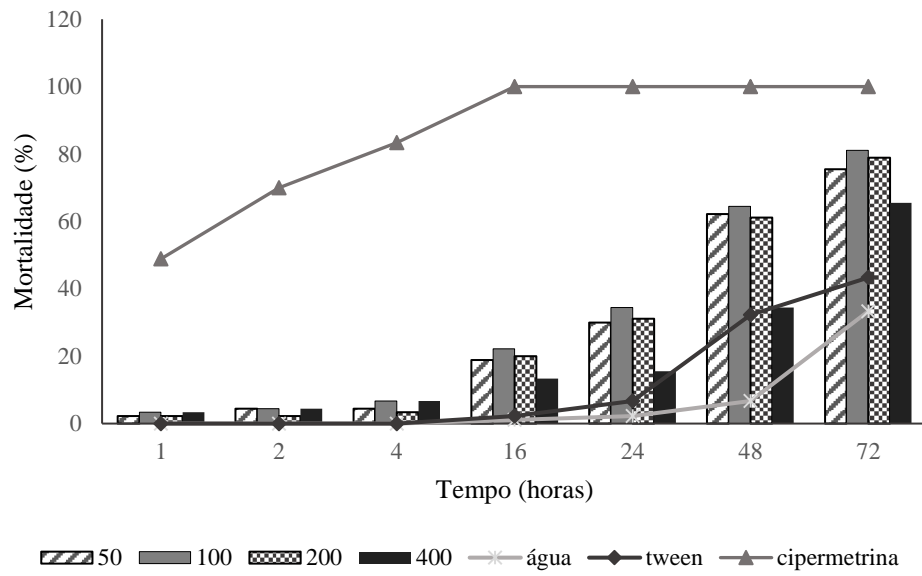


Figura 4. Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* pelo extrato hidroetanólico de folhas de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

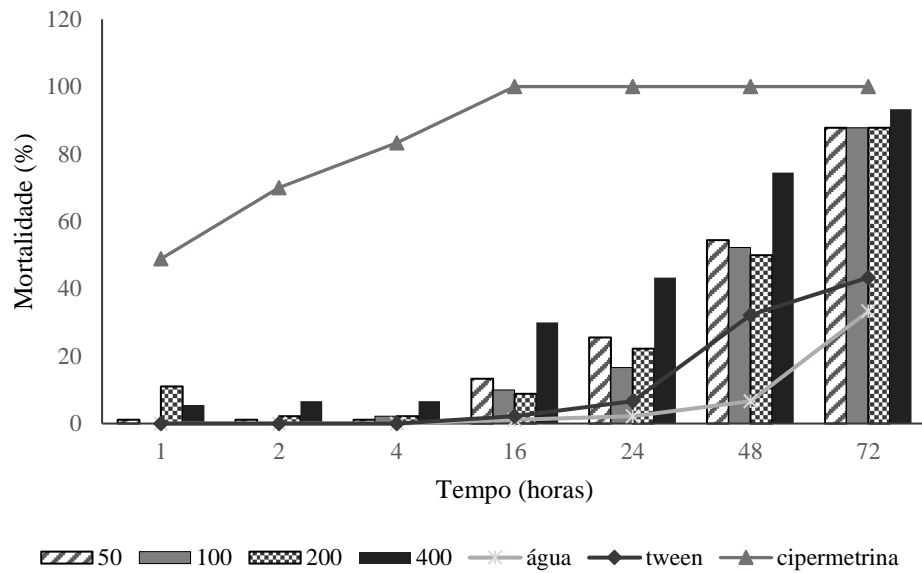


Figura 5. Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* pelo extrato hidroetanólico da casca de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

5.1.2 Extratos etanólicos

Os extratos etanólicos de pequi, tanto de folhas quanto de cascas, atingiram um valor máximo de 63,3% de mortalidade de flebotomíneos no último tempo de observação pelo extrato da casca a 50 mg.mL⁻¹ (Tabela 2). A toxicidade destes extratos sobre *Lu. longipalpis* não foi satisfatória, pois, se comparados à mortalidade registrada pelos controles negativo e Tween, não obtiveram valores estatisticamente distintos. As figuras 6 e 7 ilustram a relação entre estes grupos.

Tabela 2: Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* em contato com diferentes concentrações de extratos etanólicos de folhas e cascas de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

		Mortalidade %						
	Tratamento	1h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
Folhas	50 mg.mL ⁻¹	4,44 ^{aA}	6,67 ^{aA}	8,89 ^{aA}	13,33 ^{aA}	17,78 ^{aA}	27,78 ^{bB}	44,44 ^{cC}
	100 mg.mL ⁻¹	2,22 ^{aA}	2,22 ^{aA}	3,33 ^{aA}	7,78 ^{aA}	12,22 ^{aA}	23,33 ^{bB}	45,56 ^{cC}
	200 mg.mL ⁻¹	3,33 ^{aA}	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	8,89 ^{aA}	11,11 ^{aA}	26,67 ^{bB}	43,33 ^{cC}
	400 mg.mL ⁻¹	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	2,22 ^{aA}	3,33 ^{aA}	5,56 ^{aA}	8,89 ^{aA}	27,78 ^{bB}
Cascas	50 mg.mL ⁻¹	3,33 ^{aA}	4,44 ^{aA}	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	12,22 ^{aA}	32,22 ^{bB}	63,33 ^{dC}
	100 mg.mL ⁻¹	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	6,67 ^{aA}	8,89 ^{aA}	13,33 ^{aA}	32,22 ^{bB}
	200 mg.mL ⁻¹	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	3,33 ^{aA}	13,33 ^{aA}	30,00 ^{bB}
	400 mg.mL ⁻¹	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	11,11 ^{aA}	21,11 ^{aB}
Controles	Água	2,22 ^{aA}	3,33 ^{aA}	3,33 ^{aA}	6,67 ^{aA}	6,67 ^{aA}	7,78 ^{aA}	13,33 ^{aA}
	Tween	0,00 ^{aA}	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	5,56 ^{aA}	16,67 ^{aB}	33,33 ^{bC}
	Cipermetrina	63,33 ^{bA}	84,44 ^{bB}	93,33 ^{bB}	98,89 ^{bB}	100 ^{bB}	100 ^{cB}	100 ^{eB}
CV (%)	37,89							

Letras minúsculas comparam os valores nas colunas. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras em ordem alfabética classificam os valores em ordem crescente. Foi considerado $p < 0,05$ pelo teste de análise de variância seguido por Scott-Knott.

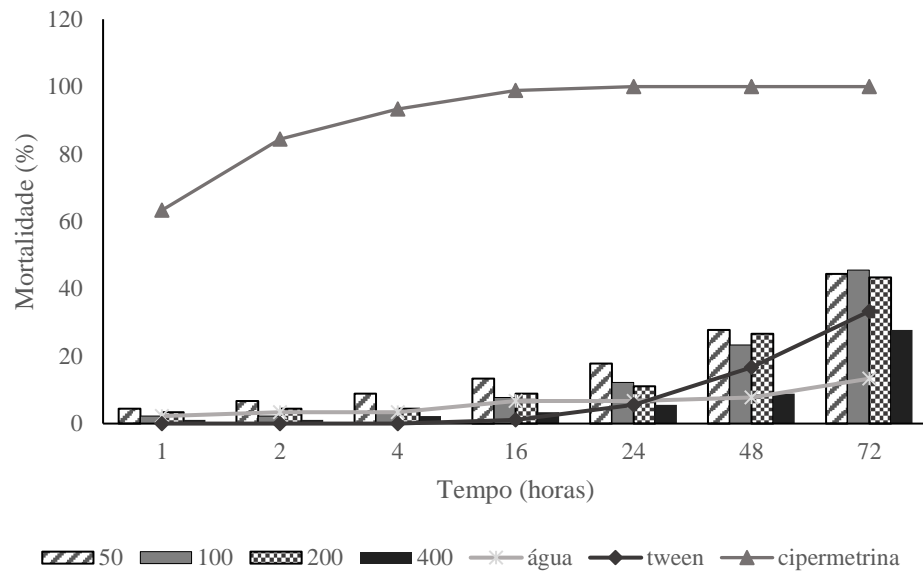


Figura 6. Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* pelo extrato etanólico de folhas de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

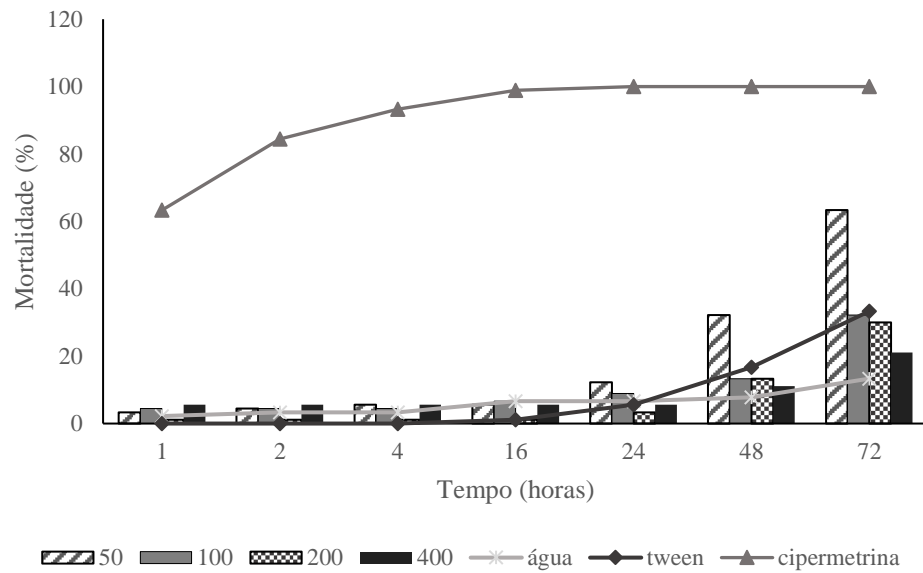


Figura 7. Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* pelo extrato etanólico da casca de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

5.1.3. Extratos ciclohexânicos

Apesar de não atingirem taxas semelhantes ao controle positivo, os extratos ciclohexânicos de folha nas concentrações de 100 e 200 mg.mL⁻¹ e o da casca a 50 mg.mL⁻¹ foram expressivos, obtendo uma mortalidade de aproximadamente 80% dos animais em 72 h de experimento (Tabela 3). Durante as observações de 24 a 72 h, nota-se que os extratos das folhas a 100 e 200 mg.mL⁻¹ se destacaram dos demais e apresentaram mortalidades semelhantes. Das cascas, o extrato na concentração de 50 mg.mL⁻¹ foi o mais tóxico aos flebotomíneos (Figuras 8 e 9).

Tabela 3: Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* em contato com diferentes concentrações de extratos ciclohexânicos de folhas e cascas de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

		Mortalidade %						
Tratamento		1h	2h	4h	16h	24h	48h	72h
Folhas	50 mg.mL ⁻¹	4,44 ^{aA}	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	6,67 ^{aA}	7,78 ^{aA}	30,00 ^{bB}	63,33 ^{cC}
	100 mg.mL ⁻¹	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	14,44 ^{aB}	18,89 ^{bB}	47,78 ^{cC}	80,00 ^{dD}
	200 mg.mL ⁻¹	5,56 ^{aA}	6,67 ^{aA}	6,67 ^{aA}	7,78 ^{aA}	20,00 ^{bA}	48,89 ^{cB}	81,11 ^{dC}
	400 mg.mL ⁻¹	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	5,56 ^{aA}	12,22 ^{aA}	17,78 ^{bA}	47,78 ^{cB}	70,00 ^{cC}
Cascas	50 mg.mL ⁻¹	2,22 ^{aA}	2,22 ^{aA}	3,33 ^{aA}	14,44 ^{aB}	24,44 ^{bB}	41,11 ^{cC}	74,44 ^{dD}
	100 mg.mL ⁻¹	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	4,44 ^{aA}	6,67 ^{aA}	15,56 ^{aA}	50,00 ^{cB}
	200 mg.mL ⁻¹	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	4,44 ^{aA}	7,78 ^{aA}	12,22 ^{aA}	33,33 ^{bB}	60,00 ^{cC}
	400 mg.mL ⁻¹	3,33 ^{aA}	3,33 ^{aA}	4,44 ^{aA}	10,00 ^{aA}	11,11 ^{aA}	33,33 ^{bB}	57,78 ^{cC}
Controles	Água	2,22 ^{aA}	2,22 ^{aA}	2,22 ^{aA}	2,22 ^{aA}	2,22 ^{aA}	3,33 ^{aA}	3,33 ^{aA}
	Tween	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	1,11 ^{aA}	3,33 ^{aA}	3,33 ^{aA}	8,89 ^{aA}	26,67 ^{bB}
	Cipermetrina	65,56 ^{bA}	65,56 ^{bA}	87,78 ^{bB}	98,89 ^{bB}	100 ^{cB}	100 ^{dB}	100 ^{eB}
CV (%)	35,03							

Letras minúsculas comparam os valores nas colunas. Letras maiúsculas comparam os valores nas linhas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. As letras em ordem alfabética classificam os valores em ordem crescente. Foi considerado $p < 0,05$ pelo teste de análise de variância seguido por Scott-Knott.

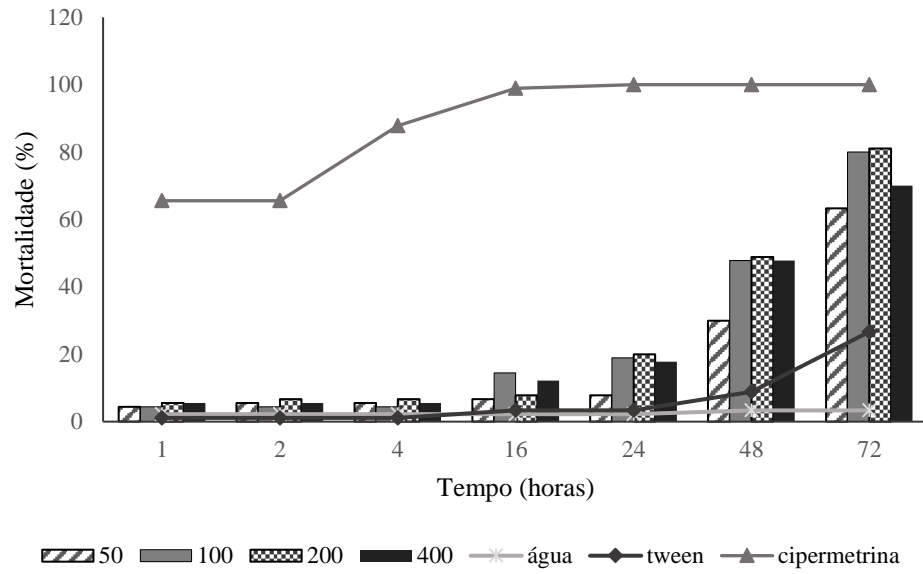


Figura 8. Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* pelo extrato ciclohexânico de folhas de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

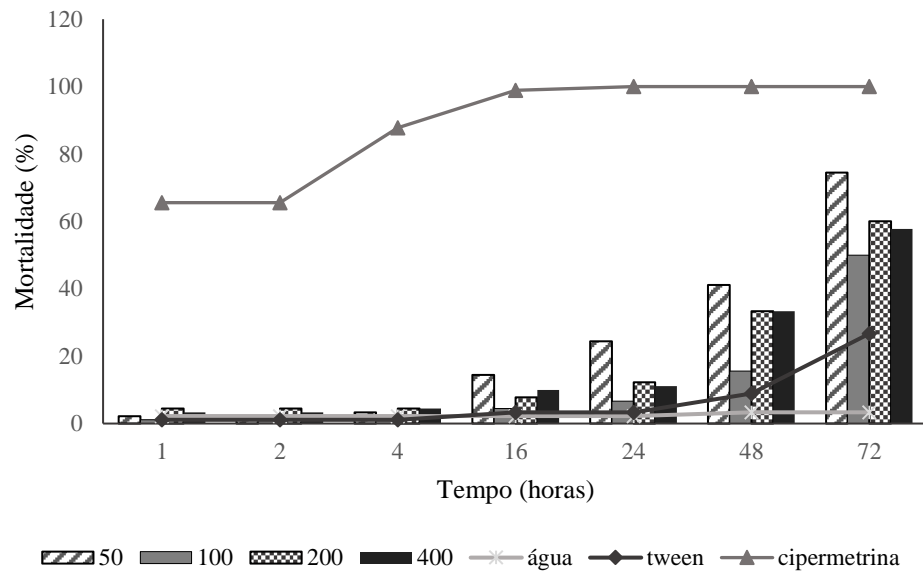


Figura 9. Porcentagem da mortalidade de *Lu. longipalpis* pelo extrato ciclohexânico da casca de *C. brasiliense* em relação ao tempo de exposição.

5.2 Identificação das classes de metabólitos secundários dos extratos

Os testes para a investigação da composição dos metabólitos secundários dos extratos de folhas e cascas de *C. brasiliense* foram baseados em colorimetria, precipitação e formação de espuma. Com base nos resultados das reações, foi possível detectar, em folhas e cascas, a presença de todos os grupos avaliados, com exceção de cumarinas (Tabela 4).

No teste com o reagente de Liebermann-Burchard, a visualização de coloração verde indicou a presença de triterpenos e de esteroides livres nos três extratos de folhas e no extrato hidroetanólico da casca.

A presença de taninos hidrolisáveis foi identificada nos extratos pela manifestação de cor azul após a reação com solução de cloreto férrico, visualizada nos extratos hidroetanólicos das folhas, no etanólico de folhas e casca e no ciclohexânico da casca. Os taninos condensados foram identificados pelo aparecimento de cor verde na amostra, sendo detectados no extrato hidroetanólico da casca. O extrato ciclohexânico das folhas não indicou a presença de taninos.

Flavonoides nos extratos foram verificados a partir da alcalinização de solução aquosa das amostras com hidróxido de amônia. A cor amarela indicou a presença de flavonas, flavonois e xantonas no extrato hidroetanólico e etanólico das folhas. O aumento do pH na solução aquosa do extrato hidroetanólico da casca indicou a presença de chalconas e auronas pelo aparecimento de coloração vermelho-púrpura, e no extrato ciclohexânico da casca foi detectada a presença de flavanonas pela cor vermelho-laranja resultante da reação.

Ao adicionar o reagente Dragendorff em soluções aquosas dos extratos, houve formação de precipitado floculoso em todos eles, com exceção do extrato hidroetanólico da casca. A precipitação indicou a presença de alcaloides nos extratos.

A agitação de soluções aquosas dos extratos mostrou que folhas e cascas de pequi contêm saponinas, pois resultou em formação de espuma persistente. O único extrato que não manifestou presença deste composto foi o ciclohexânico das folhas.

Tabela 4. Composição fitoquímica de extratos de *C. brasiliense* quanto às classes de metabólitos secundários.

	Hidroetanólico		Etanólico		Ciclohexânico	
	Folhas	Cascas	Folhas	Cascas	Folhas	Cascas
<i>Triterpenos</i>	+	+	+	-	+	-
<i>Esteroides</i>	+ ^a	+ ^a	+ ^a	-	+	-
<i>Taninos</i>	+ ^b	+ ^c	+ ^b	+ ^b	-	+ ^b
<i>Flavonoides</i>	+ ^d	+ ^e	+ ^d	-	-	+ ^f
<i>Alcaloides</i>	+	-	+	+	+	+
<i>Saponinas</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Cumarinas</i>	-	-	-	-	-	-

(+) presente; (-) ausente; (a) esteroides livres (b) taninos hidrolisáveis; (c) taninos condensados; (d) flavonas, flavonóis e xantonas; (e) chalconas e auronas; (f) flavanonas.

6. DISCUSSÃO

A OMS recomenda pesquisas em produtos alternativos para o controle de doenças vetoriais tropicais, como os produtos obtidos de fontes naturais. Preparações caseiras de plantas podem representar uma alternativa culturalmente aceitável pela população local, sendo um recurso de baixo custo e menor impacto sobre os ecossistemas (ARIAS *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam atividade tóxica de folhas e cascas de *C. brasiliense* sobre *Lu. longipalpis*. Apesar dos extratos terem causado mortalidade significativa dos flebotomíneos quando comparados ao controle negativo, apenas os extratos hidroetanólicos da casca do pequi obtiveram resultados estatisticamente significativos quando comparados à mortalidade causada pelo inseticida comercial. A metodologia escolhida para os bioensaios pode ter influenciado na mortalidade dos insetos, visto que os potes utilizados não permitiram um contato tão direto entre os flebotomíneos e os extratos. É provável que, se realizássemos estes ensaios com os testes de parede preconizados pela OMS (WHO, 2006), os resultados pudessem ser ainda mais satisfatórios.

Foi observado um declínio na mortalidade de flebotomíneos em relação às maiores concentrações dos extratos etanólicos. Isto pode ter sido causado por uma possível agregação de substâncias nas frações dos extratos, que pode levar à diminuição da biodisponibilidade dos princípios ativos responsáveis pela morte dos insetos (BRUICE, 2006).

Com relação ao tempo de observação, foi possível perceber que durante as primeiras quatro horas de experimento a mortalidade dos insetos não teve variação significativa, com exceção dos grupos tratados com a cipermetrina. Somente a partir de 16 h de contato com os extratos foi possível observar o aumento significativo da mortalidade dos insetos, o que justifica a utilização de uma metodologia que estabelece a observação a partir de 24 h de experimento por outros autores (LUITGARDS-MOURA *et al.*, 2002; MACIEL *et al.*, 2009, 2010b, 2010c).

Em todos os ensaios, foi possível perceber que a cipermetrina tem um rápido e acentuado pico de ação sobre a mortalidade dos flebotomíneos, e foi possível notar que em 24h o inseticida comercialmente utilizado foi capaz de matar todos os insetos expostos a ele. Embora exista registro da diminuição da suscetibilidade de *Lu. longipalpis* aos inseticidas comercialmente utilizados (ALEXANDER *et al.*, 2009), nossos ensaios mostraram que os flebotomíneos coletados em Aroeira são suscetíveis à α -cipermetrina. Em experimentos sobre a avaliação da vulnerabilidade da espécie aos inseticidas utilizados por programas de controle vetorial, ficou evidenciado que a sensibilidade pode variar dependendo da população de

flebotomíneos utilizada no teste (ALEXANDER *et al.*, 2009). No presente estudo, também foi observado que o Tween não interferiu na mortalidade gerada pelos extratos, corroborando com os resultados encontrados por Maciel *et al.* (2009, 2010b, 2010c).

A utilização de insetos selvagens para o experimento contribui para uma taxa variável de mortalidade natural, que pode ser atribuída à idade do flebotomíneos ou a outras condições biológicas dos mesmos, como alimentação e fatores genéticos. Porém, a vantagem de adotar esta metodologia é justificada pelo fato de utilizar populações que serão expostas aos inseticidas na aplicação do controle químico do vetor, aproximando o ensaio de laboratório às respostas de campo (SANTOS *et al.*, 2007). A utilização de animais mantidos em colônia não considera a possibilidade de observar os resultados em animais expostos às diferentes condições ambientais, biológicas e climáticas às quais se encontram os que serão expostos ao controle químico, que é o caso das populações selvagens.

A investigação fitoquímica dos extratos permite identificar uma possível explicação para sua atividade tóxica contra os organismos testados, por indicar os princípios ativos presentes no metabolismo secundário da espécie. O conhecimento a respeito da constituição química de uma planta possibilita a utilização de componentes de origem natural na formulação de fármacos, cosméticos ou com finalidade de ação tóxica sobre um agente (SIMÕES *et al.*, 2007). A composição fitoquímica do pequi foi investigada por outros autores e apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho. Com relação às classes de compostos avaliados, foi comum a presença de taninos condensados e hidrolisáveis, flavonoides e terpenoides (BEZERRA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2011).

Algumas diferenças qualitativas ou quantitativas do perfil fitoquímico de uma espécie pode ser explicada pela distribuição geográfica ou pela variação sazonal dos compostos. Sabe-se que a produção de um composto pela planta depende dos fatores químicos, físicos e biológicos do meio, podendo variar de acordo com a composição química do solo, clima, altitude e com os organismos com os quais ela interage em um determinado ecossistema (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As epidemias de dengue no Brasil fazem com que o vetor da doença seja alvo de várias pesquisas que buscam soluções para controlar a transmissão do vírus. Em revisão levantada por Garcez *et al.* (2013), foram reunidas várias substâncias com atividade larvicida em *Aedes aegypti*, e foi possível notar vários compostos comuns aos encontrados nos extratos do pequi. Destes, cita-se algumas estruturas das classes dos terpenos, saponinas, flavonoides, alcaloides.

Extratos de partes aéreas de *C. brasiliense* preparados com éter de petróleo foram testados quanto à atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis* e não se mostraram tóxicos (ARIAS

et al., 1992). A metodologia utilizada pelos autores determinou a observação da mortalidade com 6 h de exposição ao extrato, e os resultados obtidos no presente trabalho também indicam que os princípios ativos do pequi, dependendo do tipo de extrato e da concentração, não são capazes de causar mortalidade significativa antes de 24, 48 ou 72 h de exposição.

Atividades antioxidante, leishmanicida e bactericida de extratos hidroetanólicos de folhas de pequi foram identificadas por Paula-Júnior *et al.* (2006). O extrato foi capaz de inibir fortemente a proliferação de promastigotas da espécie *Le. amazonensis*, protozoário responsável por causar leishmaniose tegumentar, e também de bactérias patogênicas como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A atividade anti-parasitária de *C. brasiliense* também foi observada no extrato etanólico de cascas, em que camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* foram tratados com os extratos e obtiveram diminuição significativa da parasitemia (HERZOG-SOARES *et al.*, 2002).

Em teste para avaliação da atividade moluscicida de extrato hidroalcoólico de *C. brasiliense* sobre *Biomphalaria glabrata*, a planta se mostrou tóxica ao molusco. Utilizando metodologia semelhante para a identificação dos constituintes químicos do extrato, foram encontrados metabólitos como taninos, flavonoides, esteroides e saponinas, assim como foi verificado neste trabalho. Os autores atribuíram a atividade moluscicida do pequi às saponinas presentes no extrato (LOPES *et al.*, 2011). Essa atividade biológica também foi confirmada por Bezerra *et al.* (2002), que utilizaram o extrato etanólico de folhas e cascas da mesma espécie.

Na busca por inseticidas botânicos eficientes contra o vetor da LV, Luitgards-Moura *et al.* (2002) concluíram que extratos de duas espécies vegetais, *Antonia ovata* e *Derris amazonica*, possuem atividade inseticida sobre *Lu. longipalpis*. Os autores observaram que a mortalidade dos flebotomíneos não aumentou com o aumento da concentração dos extratos, assim como foi encontrado neste estudo.

De forma semelhante, Maciel *et al.* (2009, 2010b, 2010c) observaram o efeito letal de óleos essenciais extraídos de diversas plantas sobre flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis*. Óleos *Lippia sidoides* e de *Coriandrum sativum* mostraram-se tóxicos a ovos, larvas e adultos do inseto. Testes utilizando óleos essenciais de *Eucalyptus* também mostraram que três espécies do gênero têm efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento dos flebotomíneos, sobretudo *Eucalyptus staigeriana*, que indicou ser altamente eficiente contra todas as fases de *Lu. longipalpis*. Outra planta avaliada pelos mesmos autores foi a *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como “nim” e comprovadamente definida por apresentar princípios

ativos tóxicos a insetos. Os resultados indicaram que o óleo das sementes prejudica o desenvolvimento dos ovos e larvas e tem efeito letal também sobre os adultos.

O óleo essencial de *L. sidoides* é rico em terpenos e também se mostrou tóxico a outros insetos, sugerindo que a presença de terpenoides nos extratos de *C. brasiliense* possa ter contribuído para a letalidade de flebotomíneos no presente estudo. A atividade biológica de terpenos provenientes de organismos vegetais é extensa e bastante estudada. As piretrinas, compostos que originam os inseticidas da classe dos piretroides, tem comprovada atividade neurotóxica sobre diversos insetos e fazem parte do grupo dos terpenoides (THOLL, 2006; GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). A ação inseticida de terpenos foi comprovada em insetos-praga, como os besouros *Eptinotarsa decemlineata* (SZCZEPANIK *et al.*, 2005), *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* e *Oryzaephilus surinamensis*, e em insetos com importância na saúde pública, como *Musca domestica* e *Blatella germanica* (LEE *et al.*, 2003). Compostos da classe dos terpenos também mostraram deterrência de alimentação nos insetos das espécies *Spodoptera littoralis*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae*, e *Ropalosiphon padi* (JUSTICIA *et al.*, 2005). Também foi observada sua interferência no desenvolvimento e na mortalidade de *Rhodinus prolixus*, vetor da doença de Chagas (FIGUEIREDO *et al.*, 2017) e de *Aedes aegypti*, vetor do vírus da dengue (LIMA *et al.*, 2013). Viegas-Júnior (2003) listou vários compostos da classe dos terpenos que apresentam comprovada atividade inseticida. Sendo assim, parte da ação letal de folhas pequi pode ser explicada pela presença de terpenos, uma vez que os extratos indicaram resultado positivo para este grupo.

Existem duas principais classes de taninos produzidos pelas plantas, os condensados e os hidrolisáveis, conhecidos por apresentar diferentes atividades biológicas, como antioxidante, antisséptica, antimicrobiana e antifúngica (SCALBERT, 1991; MONTEIRO *et al.*, 2005; BARBEHEN; CONSTABEL, 2011). Alguns taninos provenientes de plantas apresentam atividade tóxica contra insetos herbívoros, porém a toxicidade pode depender da espécie da qual eles se originam (AYRES *et al.*, 1997). A ação tóxica desta classe de compostos foi registrada em vários insetos, dentre eles o vetor *Aedes aegypti* (SILVA *et al.*, 2004) e algumas espécies de coleópteros e lepidópteros (AYRES *et al.*, 1997).

Saponinas extraídas de plantas revelaram diversas atividades biológicas, como antifúngica, antiviral, antibiótica, antiparasitária e moluscicida, além de também apresentarem efeitos tóxicos sobre insetos (SPARG *et al.*, 2004; GEYTER *et al.*, 2007; SINGH e KAUR, 2018). Observou-se que as saponinas podem causar deterrência alimentar e de oviposição, repelência e mortalidade de insetos vetores de doenças, como larvas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex pipiens* (PELAH *et al.*, 2002; SANTIAGO *et al.*, 2005) e de pragas de grãos

armazenados como os coleópteros *Acanthoscelides obtectus* e *Tribolium castaneum* (PEMONGE *et al.*, 1997).

Similarmente, estudos mostraram que alguns compostos das classes dos alcaloides e dos flavonoides extraídos de plantas são promissores na busca por uma substância natural com atividade inseticida. Flavonoides mostraram atividade ovicida e deterrente de oviposição sobre o besouro *Callosobruchus chinensis*, coleóptero que afeta grãos estocados em países tropicais (UPASANI *et al.*, 2003), bem como efeito letal sobre larvas da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (ROMANELLI *et al.*, 2010). Além disso, compostos derivados de flavonoides também foram eficientes contra o agente etiológico da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, demonstrando ter atividade sobre diferentes organismos biológicos (RIBEIRO *et al.*, 1997). Ma *et al.*, 2014 constataram atividade tóxica de alcaloides sesquiterpênicos sobre os lepidópteros de importância agrícola *Mythimna separata* e *Plutella xylostella*, e sobre os dípteros *Culex pipiens* e *Musca domestica*.

Estas observações permitem a conclusão de que a mortalidade dos flebotomíneos expostos aos extratos de *C. brasiliense* ocorreu pela ação dos compostos orgânicos extraídos de suas folhas e cascas. De forma genérica, foram identificados metabólitos secundários que já possuem comprovados efeitos tóxicos sobre outros grupos de insetos, mas isto abre margem para uma análise mais detalhada da composição fitoquímica do pequi, como uma caracterização por técnicas cromatográficas, que indiquem o princípio ativo responsável pela atividade inseticida com mais exatidão.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Os extratos de folhas e cascas de *Caryocar brasiliense* apresentaram atividade inseticida sobre populações selvagens de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*;
- O extrato hidroetanólico de cascas de *C. brasiliense* foi o mais eficiente e alcançou 93,3% de mortalidade com 72h de experimento;
- A população selvagem de *Lu. longipalpis* de Aroeira/MG foi sensível à cipermetrina;
- Foi identificada a presença de triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas nos extratos de folhas e cascas de *C. brasiliense*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste preliminar da avaliação do potencial inseticida de *C. brasiliense* sobre *Lu. longipalpis* indicou que a planta possui compostos que podem ser letais aos flebotomíneos. Estes resultados contribuem com a busca de substâncias de origem natural com fins de formulação de um inseticida botânico, pois indicam que folhas e cascas de pequi contêm princípios ativos com atividade inseticida.

A maior taxa de mortalidade causada pelos extratos do pequi foi atribuída aos extratos hidroetanólicos, indicando que os metabólitos produzidos pelas folhas e cascas de *C. brasiliense* extraídos de uma solução de álcool e água podem ser estudados de forma mais minuciosa quanto ao seu potencial inseticida. A extração hidroetanólica oferece grande vantagem por ser de fácil obtenção e elaboração, tornando possível a preparação caseira de um inseticida natural que pode ser usado para contribuir de forma alternativa com os programas de controle vetorial da leishmaniose visceral.

Sendo assim, resultados encontrados neste trabalho revelam que o pequi é uma planta promissora como fonte de princípios ativos e pode ser investigada de forma mais profunda e sistemática na busca por compostos naturais com atividade inseticida.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHOUNDI, M. *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 43-49, 2016.
- ALEXANDER, B. *et al.* Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 10, p. 1272-1277, 2009.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 1-18, 2003.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e35671, 2012.
- ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 71, p. 25-29, 2009.
- AMÓRA, S. S. A. *et al.* Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 303-310, 2009.
- ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – an economically valuable species of central brazilian cerrados. **Economic Botany**, v. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.
- ARAÚJO, A. E. M. *et al.* Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, e2540, 2013.
- ARIAS, A. R.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; FALCAO, A. Feeding deterrency and insecticidal effects of plant extracts on *Lutzomyia longipalpis*. **Phytotherapy research**, v. 6, p. 64-67, 1992.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 523-532, 1996.
- AYRES, M. P. *et al.* Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. **Ecology**, v. 78, n. 6, p. 1696–1712, 1997.
- BALDINI-PERUCA, L.; LUCHEIS, S.; TOME, R. Infecção por *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) em gatos provenientes de uma área endêmica para leishmaniose canina e humana, na região sudeste do Brasil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 1, p. 216–225, 2017.

BARATA, R. A. *et al.* Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 421–425, 2005.

BARBEHENN, R. V.; CONSTABEL, C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1551–1565, 2011.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097–1106, 2007.

BEZERRA, J. C. B. *et al.* Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 428-430, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2014.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomia. In: Rangel, E. F., Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, p. 257-274, 2003.

BRUICE, P. Y. Química orgânica. **Editora Pearson**, 4 ed., v. 1, 590 pp, 2006.

CARREIRA, J. C. A. *et al.* Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 111-115, 2012.

CARREIRA, J. C. A. *et al.* *Leishmania* in marsupials: an overview of infection records in the americas and australia. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 7, p. 315-343, 2017.

CAVALCANTE, G. M., MOREIRA, A. F. C., VASCONCELOS, S. D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 9-14, 2006.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews**, v. 5, p. 873-881, 2007.

COHEN, C. *et al.* Leishmaniasis acquired in Belgium. **The Lancet**, v. 338, p. 128, 1991.

COLLEVATTI, R. G.; GRATAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 105–115, 2003.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

COSTA, C. H. N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.

COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959-2963, 2008.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361-72, 1990.

COSTA, J. M. L. *et al.* Visceral Leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil: evolution of an epidemic. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, n. 2, p. 321-324, 1995.

COSTA, P. L. *et al.* Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, p. 99–102, 2013.

COUTINHO, J. V. S. C. *et al.* Visceral leishmaniasis and leishmaniasis-HIV coinfection: comparative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 670-674, 2017.

CRUZ, I. *et al.* *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **The Lancet**, v. 359, p. 1124–1125, 2002.

CURI, N. H. A.; MIRANDA, I.; TALAMONI, S. A. Serologic evidence of *Leishmania* infection in free-ranging wild and domestic canids around a Brazilian National Park. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 99-101, 2006.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DIAS, E. S. *et al.* Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 101–111, 2011.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

FALCÃO, A. L. *et al.* Effect of deltamethrin spraying on the sandfly populations in a focus of american cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, p. 399-404, 1991.

FERNANDES, W. S. *et al.* Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban area, Central-West of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, e54, 2017.

FERREIRA, D. F. Sistema de análises de variância para dados balanceados, SISVAR 4.6. UFLA, Lavras, Brazil, 2010.

FIGUEIREDO, M. B. *et al.* Lethal and sublethal effects of essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae) and monoterpenes on Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 63-69, 2017.

GALATI, E. A. B. *et al.* An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). **Parasite**, v. 24, n. 26, 2017.

GARCEZ, W. S. *et al.* Substâncias de origem vegetal com atividade larvídica contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.

GEYTER, E. *et al.* Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects. **Pest Technology**, v. 1, n. 2, p. 96-105, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRAMICCIA, M; GRANDONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.

HERWALDT, B. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191–99, 1999.

HERZOG-SOARES, J. D. *et al.* Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 01-02, 2002.

JUSTICIA, J. *et al.* Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by titanocene (iii) – evaluation of their antifeedant activity. **European Journal of Organic Chemistry**, DOI: 10.1002/ejoc.200400634, p. 712–718, 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 279–289, 1999.

LAINSON, R. The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-27, 2005.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595-600, 1978.

LARA-SILVA F. O. *et al.* *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (syn. *Le. chagasi*) in Brazil. **BioMed Research International**, 592986, 2014.

LEE, S.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 39, p. 77 -85, 2003.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Visceral leishmaniasis and natural infection rates of *Leishmania* in *Lutzomyia longipalpis* in Latin America. In: **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. InTechOpen, 174p, 2017.

LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar Brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LIMA, G. P. G. *et al.* Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1953-1958, 2013.

LOPES, T. C. *et al.* Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. **Cadernos de Pesquisa de São Luís**, v. 18, n. 3, p. 23-30, 2011.

LOPES, D. C.; NETO, A. J. S. Preliminary Economic Study of Biodiesel Production from Pequi in Brazil. **Open Access Journal of Science**, v. 1, n. 5, p. 27, 2017.

LUITGARDS-MOURA, J. F. *et al.* Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 737-742, 2002.

- MA, Z. *et al.* Isolation and insecticidal activity of sesquiterpenes alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook f. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 642–648, 2014.
- MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 450–457, 2013.
- MACIEL, M. V. *et al.* Atividade inseticida dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Coriandrum sativum* sobre *Lutzomyia longipalpis*. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p. 77-87, 2009.
- MACIEL, M. V. *et al.* Extratos vegetais usados no controle de dípteros vetores de zoonoses. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 105-112, 2010 (a).
- MACIEL, M. V. *et al.* Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 7-11, 2010 (b).
- MACIEL, M. V. *et al.* Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 1–7, 2010 (c).
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.
- MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.
- MARIANO-DA-SILVA, S. *et al.* Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás – Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 771-777, 2009.
- MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2d. **UFC**, Fortaleza, 124 p, 1997.
- MEINECKE, C. K. *et al.* Congenital transmission of visceral leishmaniasis (kala azar) from an asymptomatic mother to her child. **Pediatrics**, v. 104, e65, 1999.
- MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: **Embrapa Agrobiologia, Documentos**, 205, 58 p, 2005.
- MICHALSKY, E. M. *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania infantum chagasi* em flebotômíneos capturados no município de Janaúba, Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 58-62, 2011.

MIMURA, A. M. S. *et al.* Determination of Cu, Fe, Mn, Zn and free fatty acids in pequi oil. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 621-626, 2016.

MISSAWA, N. A. *et al.* Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 76-78, 2011.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

NUNES, H.; ROCHA, F. L.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Bats in urban areas of Brazil: roosts, food resources and parasites in disturbed environments. **Urban Ecosystem**, DOI 10.1007/s11252-016-0632-3, 2016.

OLIVEIRA, G. C. *et al.* Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 24, n. 4, p. 464–70, 2015.

OLIVEIRA, E. F. *et al.* Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite vector interactions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, e0005401, 2017.

OLIVEIRA, S. *et al.* Presence of anti-*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania* spp. and *Ehrlichia canis* antibodies in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 243-250, 2016.

PAHO. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington: **PanAmerican Health Organization**, 2017.

PAHO. Pan American Health Organization. Plan of action for the elimination of neglected infectious diseases and post-elimination actions 2016-2022. 55th Directing council; **68th Session of the Regional Committee of WHO for the Americas**, Washington, D.C., USA, 26-30, 2016.

PASSERAT-DE-SILANS, L. N. M.; DEDET, J. P.; ARIAS, J. R. Field monitoring of cypermethrin residual effect on the mortality rates of the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis* in the State of Paraíba, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 339-404, 1998.

PASSOS, X. S. *et al.* Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

PASTORINO, A. C. *et al.* Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 120–127, 2002.

PAULA-JÚNIOR, W. *et al.* Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 625-630, 2006.

PELAH, D. *et al.* The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 407-409, 2002.

PELISSARI, D. M. *et al.* Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PEMONGE, J.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; REGNAULT-ROGER, C. Effects of material and extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. against the stored product pests *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 3, p. 209-217, 1997.

PUGEDO, H. *et al.* HP: um modelo aprimorado de armadilha luminosa de sucção para a captura de pequenos insetos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 70-72, 2005.

QUINNEL, R. J.; DYE, C.; SHAW, J. J. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 6, p. 195-200, 1992.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

RANGEL, E.; LAINSON, R. Flebotomíneos do Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 368p, ISBN: 85-7541-0020-2, 2003.

REIS, S. R. *et al.* Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 43, n. 1, p. 121-124, 2013.

REIS, L. L. *et al.* Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638-645, 2017.

REY, L. *et al.* American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. 73–78, 2005.

- RIBEIRO, A. *et al.* Trypanocidal Flavonoids from *Trixis vauthieri*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 836-838, 1997.
- RIBEIRO, I. C. O. *et al.* Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 32, 2018.
- ROESLER, R. *et al.* Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 711–717, 2008.
- ROMANELLI, G. P. *et al.* Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR study and insecticidal activity against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6290–6295, 2010.
- ROQUE, A. L. R. *et al.* *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: patterns of experimental infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 4, n. 2, e589, 2010.
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, p. 251–262, 2014.
- ROSÁRIO, I. N. G. *et al.* Evaluating the adaptation process of sandfly fauna to anthropized environments in a leishmaniasis transmission area in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, v. 23, p. 1–10, 2016.
- SANTIAGO, G. M. P. *et al.* Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 187-190, 2005.
- SANTOS, R. C. *et al.* Avaliação do efeito residual de piretróides sobre anofelinos da Amazônia brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 2, p. 276-83, 2007.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
- SZCZEPANIK, M.; DAMS, I.; WAWRZENCZYK, C. Feeding deterrent activity of terpenoid lactones with the p-menthane system against the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Entomological Society of America**, v. 34, n. 6. p. 1433-1440, 2005.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671-683, 1996.

- SHERLOCK, I. A. Importância médico-veterinária. In: Rangel, E. F., Lainson, R. Flebotomíneos do Brasil. **Editora da Fundação Oswaldo Cruz**, p. 15-19, 2003.
- SILVA, H. H. G. *et al.* Atividade larvicide de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Editora UFRGS**, Porto Alegre, 6 ed. 1104p. 2007.
- SINGH, B.; KAUR, A. Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: a review. **Food Science and Technology**, v. 87, p. 93-101, 2018.
- SOUZA, N. A.; BRAZIL, R. P.; ARAKI, A. S. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 161-174, 2017.
- SOUSA-GOMES, M. L. *et al.* Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 4, p. 519-526, 2011.
- SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219–243, 2004.
- THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 297–304, 2006.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a Review. **F1000 Research**, v. 6, p. 750-765, 2017.
- UPASANI, S. M. *et al.* Partial characterization and insecticidal properties of *Ricinus communis* L. foliage flavonoids. **Pest Management Science**, v. 59, p. 1349–1354, 2003.
- VIANNA, E. N. *et al.* Abundance of *Lutzomyia longipalpis* in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 302-310, 2016.
- VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- VON ZUBEN, A. P. B.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, e00087415, 2016.

WHO. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Department of Control of Neglected Tropical Diseases**, v. 38, n. 92, p. 557-565, 2017.

WHO. World Health Organization. WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. Control of neglected tropical diseases who pesticide evaluation scheme, v. 3: 60 pp, 2006

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, v. 54: 881 pp, 1994.

ZOUBIRI, S.; BAALIOUAMER, A. Potentiality of plants as source of insecticide principles. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 925–938, 2014.